

一期梅毒半巢式聚合酶链反应检测的效果

周潇¹, 朱晓洁², 李惠兰²

摘要 :目的 探讨半巢式聚合酶链反应(PCR)在一期梅毒早期诊断中的意义。方法 应用半巢式 PCR 检测一期梅毒溃疡组织液和血清中 TP-DNA, 与 TPPA 结果进行比较。结果 60 例临床诊断为一期梅毒患者, 溃疡组织液、血清半巢式 PCR 和 TPPA 检测的阳性分别为 56 例(93.33%)、13 例(21.67%)和 53 例(88.33%)。组织液半巢式 PCR 检测结果与血清半巢式 PCR 检测结果比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与 TPPA 结果比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 半巢式 PCR 检测一期梅毒溃疡组织液中 TP-DNA 较检测血清中的 TP-DNA 敏感性高、特异性强, 可做为 TPPA 诊断早期梅毒的有效补充。

关键词 :一期梅毒 ;半巢式 PCR ;TPPA

中图分类号 :R759.1 文献标识码 :A 文章编号 :1009-9727(2012)1-90-02

Application of semi-nested PCR for diagnosis of primary syphilis. ZHOU Xiao ZHU Xiao-jie LI Hui-lan. (Huizhou First Hospital Huizhou 516003 Guangdong P. R. China)

Abstract :Objective To explore semi-nested polymerase chain reaction (semi-nested PCR) in diagnosis of primary syphilis. Methods Ulcer secretion and blood sample were collected from primary syphilis patients, and semi-nested PCR was used to identify the presence of TP-DNA. The positive rates were compared with treponema pallidum particle assay (TPPA). Results Samples were collected from 60 patients. The positive rates of semi-nested PCR for ulcer secretion, serum and TPPA were 93.33%, 21.67% and 88.33%, respectively. There was statistically significance ($P < 0.05$) between semi-nested PCR determination of ulcer secretion and semi-nested PCR determination of serum, but there was no significant differences in the comparison with TPPA ($P > 0.05$). Conclusion The sensitivity and specificity of semi-nested PCR for determination of ulcer secretion were higher than that of semi-nested PCR for determination of serum, therefore it can be a supplement for diagnosis of early syphilis by TPPA.

Key words :Primary syphilis ;Semi-nested PCR ;TPPA

在性传播疾病(STDs)中,梅毒的危害性和致死性仅次于艾滋病^[1]。梅毒的临床表现十分复杂,实验室诊断主要依靠血清学方法查抗体,但由于早期梅毒患者感染梅毒螺旋体(TP)时间较短,抗体滴度较低,血清学试验会出现阴性结果,导致漏诊。为了探讨半巢式聚合酶链反应方法在一期梅毒早期诊断中的意义,我们应用半巢式 PCR 方法对临床诊断为一期梅毒患者的溃疡组织液和血清进行检测,并与梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)结果进行比较。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 材料 菌株 TP-Nichols 标准株(惠州疾病预防控制中心惠赠);TPPA 试验试剂盒由日本富士株式会社生产。

1.1.2 样本来源 60 例标本取自本院皮肤科门诊就诊者,患者就诊前均有不洁性生活史或性伴侣有性病史,外生殖器部位浅表溃疡和具有软骨硬度的结节 1~4 个,临床诊断为一期梅毒。其中男 42 例,女 18 例,年龄 19~60 岁,平均 32.7 岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 患者分别刮取溃疡面组织液和抽取 3ml 血液。溃疡面组织液洗脱于装有 0.5ml 无菌生理盐水的 Eppendorf

管中,集中冻存于 -70℃ 冰箱做半巢式 PCR;血液标本离心取血清,分别做半巢式 PCR 和 TPPA。

1.2.2 TPPA 试验 按 TPPA 试验试剂盒说明书要求操作。

1.2.3 半巢式 PCR 扩增 polA 基因 扩增引物与扩增条件参考文献^[2]引物 F2 :GTG TGC ACT C GGCAT TAC AGR2 :GTC TGA GCA C ;I-II :GCA CCGTA ;F3 :TGA AGC TGA CGA CCT CAT TG。反应体系为 25μl 1× PCR 缓冲液 (1.5mol/L MgCl₂), dNTPs 0.2mmol/L, 引物 0.5pmol/L, Taq 酶 0.5U, DNA 模板 2μl (外循环)或 1μl (内循环)。反应条件:外循环以 F2 和 R2 为引物,94℃ 5min,94℃ 15s,56℃ 30s,72℃ 45s,循环 20 次,72℃ 延伸 5min;内循环以 F3 和 R2 为引物,94℃ 5min,94℃ 15s,56℃ 30s,72℃ 45s。循环 30 次,72℃ 延伸 7min。PCR 扩增设阴性对照(PBS)和阳性对照(TpNichols 标准株)。取扩增终产物 10μl,用 2% 琼脂糖电泳(3V/cm, 2h),EB 染色 10min,紫外灯下观察结果。

2 结果

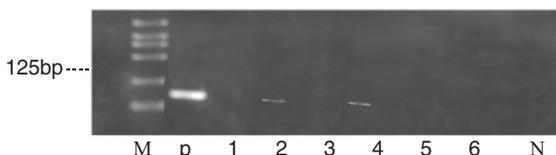
2.1 半巢式 PCR 检测结果 半巢式 PCR 检测血清和溃疡组织液标本的结果,见图 1~2。

2.2 半巢式 PCR 和血清学方法检测 组织液半巢式 PCR 检

作者单位 :1.惠州市第一人民医院检验科 广东 惠州 516003 ; 2.惠州市中心人民医院检验科 广东 惠州 516001

作者简介 :周潇(1969~),女,副主任技师,主要从事临床检验研究。

测结果的阳性率为 93.33%，而血清半巢式 PCR 检测结果的阳性率仅为 21.67%，两者相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，而 TPPA 检测结果的阳性率与组织液半巢式 PCR 检测结果相当，两者相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见表 1。其中 11 例血清半巢式 PCR 的检测结果为阳性者，组织液半巢式 PCR 都为阳性；4 例组织液半巢式 PCR 阳性，而 TPPA 阴性；1 例 TPPA 阳性，组织液半巢式 PCR 阴性。

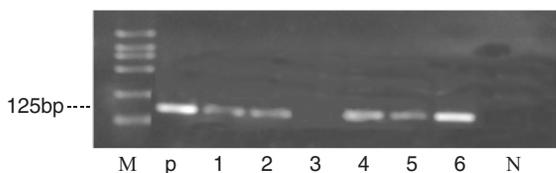


注：M DNA Marker；p 阳性对照 (TP 标准株)；1~6 为临床血清标本；N：阴性对照

Note：M DNA maker；p Positive control (TP strain)；1-6 is serum sample；N negative control

图 1 半巢式 PCR 检测一期梅毒血清 PCR 电泳图

Fig 1 Result of serum sample measured by semi-nested-PCR



M DNA Marker；p 阳性对照 Positive Control (TP 标准株)；1~6 为临床溃疡组织液标本 (1-6 is ulcer sample)；N 阴性对照 (Negative control)

图 2 半巢式 PCR 检测一期梅毒溃疡组织 PCR 电泳图

Fig 2 Result of ulcer secretion sample measured by Semi-nested-PCR

表 1 半巢式 PCR 与 TPPA 检测结果比较

Tab 1 Compare results of 60 patients measured by Semi-nested PCR and TPPA

检查方法 Method	阳性 Pos	阴性 Neg	合计 Total	阳性率 Rate (%)
组织液半巢式 PCR	56	4	60	93.33
血清半巢式 PCR	13	47	60	21.67 Δ
血清 TPPA	53	7	60	88.33

注：与组织液巢式 PCR 比较 $\Delta P < 0.05$ 。

Note：compared to nested PCR $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

PCR 是诊断梅毒的新方法，已经广泛运用于梅毒的诊断^[3-5]，但引物的特异性和敏感性仍是当前梅毒基因诊断的两大主要问题。当用常规 PCR 扩增标本时，由于标本中存在不明的、难以去除的 PCR 抑制物，因而阳性率低^[6]。半巢式 PCR 是一种以第一对引物扩增的片段为模板再次进行扩增的方法，增加了检测的敏感性和特异性，而且再次扩增只增加了一条扩增引物，引物不需要标记，扩增无需专用荧光定量 PCR 扩增仪，因此具有敏感、特异、低成本等优点。Behrhof 等^[2]用半巢式 PCR 扩增福尔

马林固定和石蜡包埋的活检标本显示较常规 PCR 敏感性明显增加。

本研究中，有 4 例组织液半巢式 PCR 阳性，而 TPPA 阴性，这可能是梅毒感染早期特异性 TP-gG 抗体尚未产生，或滴度太低而未达到检测下限所致。1 例 TPPA 阳性，组织液半巢式 PCR 阴性，可能因取材不当，或病人处于初期梅毒的晚期，组织液中 TP 含量极低，存在难以去除的 Taq 酶抑制因子有关。

半巢式 PCR 扩增血清中的 TP-DNA 阳性率较低，仅有 21.67%，而半巢式 PCR 扩增组织液中的 TP-polA 基因阳性率高达 93.33%，两者相比有统计学意义 ($P < 0.05$)；与半巢式 PCR 扩增组织液中的 TP-DNA 相比，TPPA 检测 TP 的阳性率与其相当，两者相比无统计学意义，这表明对于早期梅毒，取组织液标本做半巢式 PCR 检测 TP-DNA 敏感度高，特异性强，可作为检测早期梅毒的新方法，作为血清学方法的有效补充。

参考文献：

- [1] Zeng TB, Wu YM, Zhao FJ et al. Amplification of the DNA Polymerase I Gene of Treponema Pallidum Pallidum from Whole Blood of Persons With Syphilis Using a Semi-nested PCR Assay[J]. Journal Of Nanhua University, 2009, 37(6): 648-650. (In Chinese) (曾铁兵, 吴移谋, 赵飞骏, 等. 半巢式聚合酶链反应扩增全血中梅毒螺旋体 polA 基因[J]. 南华大学学报, 2009, 37(6): 648-650.)
- [2] Behrhof W, Springer E, Braeuninger W et al. PCR testing for Treponema pallidum in paraffin-embedded skin biopsy specimens: test design and impact on the diagnosis of syphilis [J]. J Clin Pathol, 2008, 61(3): 390-395.
- [3] Liu H, Rodes B, Chen CY et al. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of Treponema pallidum in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(5): 1941-1946.
- [4] Wu MC, Zhu HL, Yan JL et al. Clinical significance of FQ-PCR in primary syphilis diagnosis [J]. Journal Of Clinical Dermatology, 2002, 31(3): 162-163. (In Chinese) (武明昌, 朱慧兰, 颜景兰, 等. 荧光定量聚合酶链反应在一期梅毒诊断中的临床意义探讨[J]. 临床皮肤科杂志, 2002, 31(3): 162-163.)
- [5] Liu AY, Yin PS, JF et al. Detection of Treponema pallidum by polymerase chain reaction [J]. Journal Of Clinical Dermatology, 2004, 33(7): 413-415. (In Chinese) (刘爱英, 尹跃平, 孙建方, 等. 聚合酶链反应对一期梅毒患者的诊断[J]. 临床皮肤科杂志, 2004, 31(3): 162-163.)
- [6] Grimprel E, Sanchez PJ, Wendel GD et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect Treponema pallidum in amniotic fluid[J]. J. Clin. Microbiol, 1991, 29: 1711-1718.

收稿日期 2011-06-24 编辑 符式刚